

预冻温度对罗非鱼皮胶原纤维海绵结构及性能影响

姜志聪, 闫鸣艳*

青岛科技大学, 化学与分子工程学院, 山东 青岛

收稿日期: 2024年5月31日; 录用日期: 2024年6月20日; 发布日期: 2024年6月28日

摘要

本研究以罗非鱼皮为原料, 探究预冻温度 -20°C (CFS/ -20)、 -40°C (CFS/ -40)、 -60°C (CFS/ -60)、 -80°C (CFS/ -80)以及液氮速冻(CFS/LN)对自组装胶原纤维海绵(CFS)结构及性能的影响。扫描电子显微镜(SEM)和X射线衍射图谱(XRD)结果表明, 随着预冻温度降低, 罗非鱼皮自组装胶原纤维海绵结构致密度逐渐减小, CFS/ -20 最为致密, 且海绵的纤维直径逐渐变大。通过测定胶原纤维海绵的孔隙率、吸水率和保水率, 发现CFS/ -20 、CFS/ -40 、CFS/ -60 、CFS/ -80 、CFS/LN的孔隙率和吸水率逐渐增大。ATR-FTIR结果显示, CFS/ -20 到CFS/ -80 于酰胺A带波数略有增加, 表明氢键作用减弱。且随着温度降低, 压缩强度减小, 机械性能下降, 抗酶解性减弱。综上所述, 预冻温度对罗非鱼皮胶原纤维海绵的结构及性能具有显著影响。

关键词

罗非鱼, 鱼皮, 预冻温度, 胶原纤维海绵, 结构性能

Effect of Pre-Freezing Temperature on the Structure and Properties of Tilapia Skin Collagen Fiber Sponge

Zhicong Jiang, Mingyan Yan*

School of Chemistry and Molecular Engineering, Qingdao University of Science and Technology, Qingdao Shandong

Received: May 31st, 2024; accepted: Jun. 20th, 2024; published: Jun. 28th, 2024

*通讯作者。

Abstract

This study investigates the effect of pre-freezing temperatures (-20°C (CFS/ -20), -40°C (CFS/ -40), -60°C (CFS/ -60), -80°C (CFS/ -80), and liquid nitrogen flash freezing (CFS/LN)) on the structure and properties of self-assembled collagen fiber sponge (CFS) derived from tilapia skin. Scanning electron microscopy (SEM) and X-ray diffraction (XRD) results indicate that with decreasing pre-freezing temperature, the structure density of tilapia skin self-assembled collagen fiber sponge gradually decreases, with CFS/ -20 being the most dense, and the fiber diameter of the sponge gradually increases. The porosity, water absorption rate, and water retention rate of the collagen fiber sponge increase gradually from CFS/ -20 to CFS/ -80 and CFS/LN. ATR-FTIR results show a slight increase in the wave number of the amide A band from CFS/ -20 to CFS/ -80 , indicating a weakening of hydrogen bonding. Furthermore, with decreasing temperature, the compressive strength decreases, mechanical properties decline, and resistance to enzymatic degradation weakens. In conclusion, pre-freezing temperature significantly affects the structure and properties of tilapia skin collagen fiber sponge.

Keywords

Tilapia, Fish Skin, Pre-Freezing Temperature, Collagen Fiber Sponge, Structural Properties

Copyright © 2024 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

胶原蛋白是一类广泛存在于哺乳动物的软骨、皮肤以及其他结缔组织中的天然大分子蛋白。因其具有生物相容性、生物降解性、生物安全性、低免疫性和止血性等良好的生物学性能,被广泛应用于食品、化妆品、生物材料、医药等领域[1]。传统上,陆生动物如猪、牛等一直是胶原蛋白类产品的主要来源,然而,陆地动物来源的胶原蛋白由于受到诸如口蹄疫(FMD)、疯牛病(TSE)等人兽共患病的威胁,以及宗教信仰的限制,如伊斯兰教对猪肉制品的禁令,使其在应用上受到限制[2]。因此,水产动物以其安全性高、胶原蛋白含量高、来源广泛、易于提取和无宗教限制等优点越来越受到关注,被视为陆生动物胶原蛋白的重要替代来源[3]。罗非鱼因其生长快速、繁殖力强、产量高、适应性强等优点,得到了联合国粮农组织的推广[4]。我国是世界上最大的罗非鱼养殖国,也是最大的罗非鱼出口国[5]。罗非鱼在加工产品过程中会产生大量的副产物例如鱼鳞、鱼皮等,这些副产物大多被丢弃,基本没有被充分利用[6]。鱼皮是水产品加工中丰富的副产物之一,罗非鱼皮胶原蛋白含量高,脂肪含量较低,是提取胶原蛋白的理想原材料[7]。综合研究和利用罗非鱼皮胶原蛋白,有助于实现罗非鱼皮副产物的高值化利用,减少环境污染和资源浪费,提高经济利润和社会效益。

胶原纤维是由交错的微原纤维组合而成的具有层层缠绕状结构的蛋白,在罗非鱼皮组织结构中广泛存在。在稀醋酸体系中,将鱼皮先进行酸松弛,然后利用胃蛋白酶进行水解,打开胶原纤维之间的连接键,可获得具有更多活性基团的纤维束形状的胶原纤维[8]。胶原纤维海绵制备方法主要包括两种:一种是胶原分子低温成胶后冷冻干燥形成的胶原海绵,另一种是由胶原先自聚集形成水凝胶后经冷冻干燥制备而成的胶原纤维海绵。冷冻干燥是胶原海绵制备工艺中的关键一步,是通过在真空条件下直接升华固

态中的水分, 获得疏松多孔的海绵结构的一种方法。冷冻干燥技术操作简便, 低温条件下不会破坏胶原材料的结构和性能, 是制备海绵材料的常用方法[9]。胶原纤维海绵的高孔隙率, 优异的生物相容性和促凝特性, 使其在伤口敷料和药物缓释等生物医用材料领域具有广阔的应用前景。目前对于胶原纤维海绵的研究, 主要集中在胶原纤维海绵的改性。如 Yan 等[10]利用冻干工艺制备了氧化白芨改性的胶原纤维复合止血海绵, 发现其多孔三维网络结构带来了优异的膨松性和吸水性; 同时, 该海绵符合细胞毒性分级标准的安全性能要求, 是一种具有应用潜力的优良止血材料。此外, 还发现探讨胶原海绵冻干工艺的研究。如 Pawelec 等[11]发现采用冻干法来制备胶原材料的过程中, 所使用的模具的散热速率对于材料的孔隙结构有着显著的影响。通过模具设计控制冷冻干燥中的散热速率, 能够有效地调控胶原材料的孔隙结构, 优化其性能。通常, 冷冻干燥过程分为预冻和冷冻干燥两个阶段。预冻阶段的条件对海绵的表面和内部结构以及物理化学性能有极大的影响, 即不同的预冻条件产生不同品相的海绵。但是目前关于预冻温度对胶原纤维海绵结构和性能影响的研究较少。本研究拟采用 -20°C 、 -40°C 、 -60°C 、 -80°C 以及液氮预冻处理罗非鱼皮胶原纤维海绵, 采用扫描电镜、红外光谱、X 射线衍射光谱对海绵结构和形貌特征进行表征。并对其性能进行了评价, 包括机械性能、孔隙率、抗酶解性、吸水率和保水率等。明确预冻温度变化对罗非鱼皮胶原纤维海绵的结构和性能的影响, 为胶原基生物材料的制备和开发提供依据和参考。

2. 实验部分

2.1. 材料与试剂

罗非鱼皮采购于广东水产品加工厂, -20°C 保存; 氢氧化钠, 国药集团化学试剂有限公司; 冰醋酸, 国药集团化学试剂有限公司; 氯化钠, 国药集团化学试剂有限公司; 磷酸氢二钠, 国药集团化学试剂有限公司; 磷酸二氢钠, 国药集团化学试剂有限公司; 胃蛋白酶, 北京索莱宝科技有限公司; I 型胶原酶, 德国 Biofroxx 生物试剂。

2.2. 仪器与设备

真空冷冻干燥机, FD5 型, 北京金西盟仪器有限公司; 扫描电子显微镜, JSM-6700F 型, 日本 JEOL 公司; 衰减全反射傅里叶变换红外光谱仪, Nicolet 6700 型, 美国 Thermo Fisher Scientific 公司; X 射线衍射仪, D/MAX/2500 PC 型, 日本 Rigaku 公司; 电子万能试验机, UTM6000 型, 深圳三思纵横科技股份有限公司; 高速冷冻离心机, CT14RD II 型, 上海天美科学仪器有限公司; 医用低温冰箱, HD-86L390 型, 海信集团有限公司。

2.3. 实验方法

2.3.1. 罗非鱼皮酶促溶性胶原的制备

罗非鱼皮酶促溶性胶原的制备参考 Xiang [12]的方法。取适量鱼皮剪成块状, 按照料液比 1:20 加入 10% 正丁醇溶液, 在 4°C 下脱脂 8 h, 并重复三次; 用蒸馏水冲洗干净后, 再按照相同比例加入 0.1 mol/L 的 NaOH 溶液浸泡 24 h 以除去非胶原成分。水洗至中性后按照 1:50 的比例在鱼皮中加入 0.5 M 的醋酸溶液, 并加入鱼皮质量 0.5% 的胃蛋白酶于 4°C 条件下搅拌提取 48 h, 离心收集上清液。加入 NaCl 至终浓度为 0.9 M 盐析, 离心收集沉淀溶于 0.5 M 醋酸溶液中, 用 0.02 M 的 Na_2HPO_4 溶液透析 24 h, 再用 0.1 M 醋酸溶液透析 24 h, 最后用蒸馏水透析 48 h, 冻干得酶促溶性胶原(Pepsin-soluble collagen, PSC)。

2.3.2. 胶原纤维海绵的构建

将一定质量胶原加入浓度为 0.5 M 的醋酸溶液中, 在 4°C 下搅拌溶解 24 h 制备质量浓度 10 mg/mL 的胶原溶液。加入等体积的 40 mM 磷酸盐缓冲液(PBS, pH 7.4)于冰浴中混合, 调节 pH 7.4。取 3 mL 加入

12 孔板中, 立即置于 28℃ 条件下自聚集过夜, 用蒸馏水浸泡脱盐 48 h。将水凝胶分别于 -20℃、-40℃、-60℃、-80℃ 以及液氮条件下预冻 48 h, 然后冻干得海绵。为表述方便, 所得胶原纤维海绵分别标记为 CFS/-20、CFS/-40、CFS/-60、CFS/-80 和 CFS/LN。

2.3.3. 扫描电子显微镜(SEM)

将海绵在真空状态下喷金, 用 SEM 观察海绵的微观结构, 设置电子束的加速电压为 10 KV。

2.3.4. 衰减全反射傅里叶变换红外光谱分析(ATR-FTIR)

用 ATR-FTIR 对海绵进行红外光谱扫描, 波长为 4000~500 cm^{-1} , 扫描 64 次, 分辨率为 2 cm^{-1} 。

2.3.5. X 射线衍射图谱(XRD)

采用 XRD 检测海绵结构, 扫描速度为 10 °/min, 扫描角度为 5~40° (2 θ), X 射线源为 Cu Ka, 电压为 40 KV。

2.3.6. 海绵的孔隙率

参考 Feng [13] 的方法测定罗非鱼皮胶原纤维海绵的孔隙率。首先称量海绵样品的质量, 将无水乙醇装满于 15 mL 的玻璃容器称重, 其次将海绵放入玻璃容器中浸泡, 超声 5 min 以去除海绵孔隙中的空气, 随后称量再次倒满无水乙醇的玻璃容器质量。将海绵取出后, 称量玻璃容器和剩余无水乙醇的质量。按照公式(1)计算海绵孔隙率:

$$\text{Porosity} = \frac{W_2 - W_3 - W_0}{W_1 - W_3} \times 100\% \quad (1)$$

式中: W_0 为海绵的质量; W_1 为装满无水乙醇的玻璃容器质量; W_2 为海绵脱气后装满无水乙醇的玻璃容器质量; W_3 为取出海绵后剩余无水乙醇和玻璃容器的质量。

2.3.7. 海绵的吸水率和保水率

参考 Xiang [12] 的方法测定罗非鱼皮胶原纤维海绵的吸水率和保水率。首先称量海绵样品的质量, 取 40 mM 的 PBS 溶液(pH 7.4), 预热至 37℃。然后将海绵放入其中, 在 37℃ 下恒温孵育 24 h, 用镊子将海绵取出悬停 1 min, 沥干表面水分后称重。将滤纸铺垫于离心管底部, 然后将海绵放入其中, 500 r/min 离心 5 min 后称重。按照公式(2)和(3)计算海绵吸水率和保水率:

$$\text{Water absorption ratio} = \frac{W_1 - W_0}{W_0} \times 100\% \quad (2)$$

$$\text{Water retention ratio} = \frac{W_2 - W_0}{W_0} \times 100\% \quad (3)$$

式中: W_0 为海绵的质量; W_1 为恒温孵育后海绵的质量; W_2 为离心后海绵的质量。

2.3.8. 海绵的机械性能

参照 Xiao [14] 的方法测定胶原纤维海绵的机械性能。采用电子万能试验机测定胶原纤维海绵的压缩强度。测试速度为 5 mm/s, 最大应变量为 80%。

2.3.9. 海绵的抗酶解性能

参考 Fernandes [15] 的方法测定胶原纤维海绵的抗酶解性能。将 I 型胶原酶(≥ 125 U/mg)溶于 50 mM Tris-HCl 缓冲液(pH 7.4, 0.36 mM CaCl₂)中。精确称取一定质量的冻干圆片状胶原纤维海绵, 将其浸没于酶液中, 使酶与海绵的比值为 2 U/mg。于 37℃ 条件下静置, 每隔一段时间取出, 然后置于冰浴中终止酶

解反应。将海绵用蒸馏水冲洗三次后冻干、称量质量, 则海绵的降解率按照公式(4)进行计算:

$$\text{Enzymatic degradation ratio} = \frac{W_0 - W_1}{W_0} \times 100\% \quad (4)$$

式中: W_0 为酶降解前海绵的初始质量; W_1 为降解后海绵在预定时间的质量。

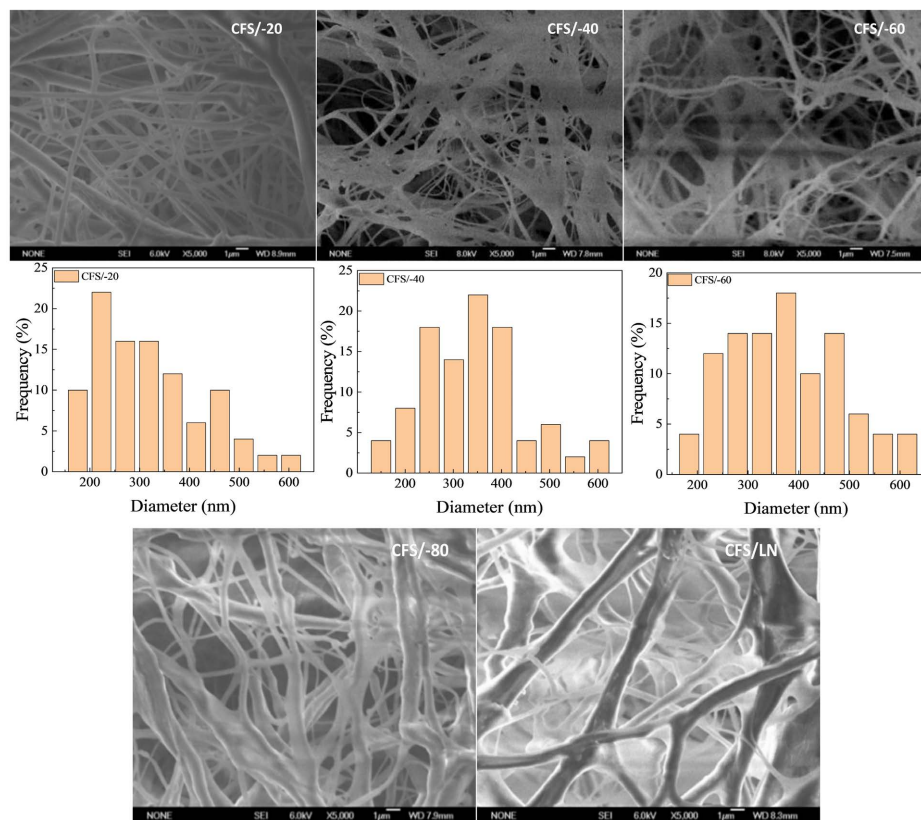
2.3.10. 数据分析

每组实验设 3 个平行实验, 采用 Excel 2021 进行数据统计分析, Origin 2018 作图。

3. 结果与讨论

3.1. 预冻温度对胶原纤维海绵微观结构的影响

罗非鱼皮胶原纤维海绵是由胶原经过自组装形成的, 如图 1 所示, 经不同预冻温度处理后, 其微观结构均为由胶原纤维形成的三维网络结构, 与鲫鱼皮胶原蛋白[16]和牛皮胶原蛋白[17]自聚集形成的结构类似。然而, 可以明显发现网络结构中胶原纤维致密度的不同, 随着预冻温度的降低, 胶原纤维的密度逐渐降低。这是因为若预冻温度较高, 凝胶经预冻后存在明显的体积缩小的现象。海绵的胶原纤维致密度的变化, 将对其机械性能、孔隙率、溶胀性等产生重要的影响[18]。已有研究表明, 胶原纤维的组装成束及纤维结构的构象可能会受到单个胶原纤维之间的静电相互作用影响[19]。CFS/-20、CFS/-40、CFS/-60、CFS/-80 和 CFS/LN 的纤维平均直径为 318.86 ± 111.62 、 341.59 ± 106.49 、 372.01 ± 111.53 、 408.25 ± 135.43 和 442.29 ± 160.14 nm, 随着预冻温度降低, 纤维直径逐渐变粗。该研究结果与 PC 交联导致鱼皮胶原纤维变细的报道不同[12]。胶原纤维海绵的三维网络结构使其具有良好的生物降解性、生物相容性及低免疫原性等生物学特性[10]。



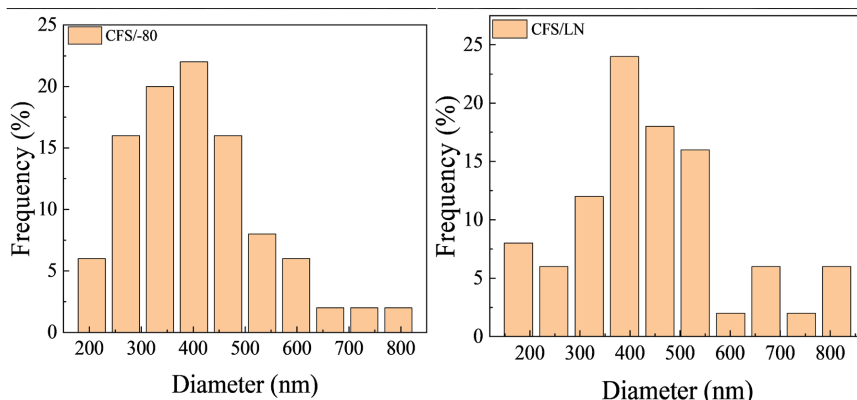


Figure 1. SEM images and distributions of diameters of collagen fibrillar sponge
图 1. 胶原纤维海绵的 SEM 图和纤维直径分布图

3.2. 预冻温度对胶原纤维海绵 ATR-FTIR 的影响

如图 2 所示, 经不同预冻温度处理后, 胶原纤维海绵 ATR-FTIR 图主要包括酰胺 A、B、I、II 和 III 五个特征吸收带。酰胺 A 带主要由 N-H 键的伸缩振动引起, 其波数范围为 $3400\sim 3450\text{ cm}^{-1}$, 但当 N-H 基团参与氢键形成时, 酰胺 A 带会向低波数移动, 通常在 3300 cm^{-1} 左右[20]。酰胺 B 带位于 2930 cm^{-1} 左右, 由 CH₂ 基团的不对称伸缩振动产生。酰胺 I 带一般在 $1625\sim 1690\text{ cm}^{-1}$ 范围内, 主要与 C=O 的伸缩振动有关。酰胺 II 带通常在 $1530\sim 1600\text{ cm}^{-1}$ 范围内, 由 N-H 平面弯曲和 C-N 伸缩振动耦合形成。酰胺 III 带的吸收峰位于 1240 cm^{-1} 附近, 是由 C-N 伸缩振动以及 C-N-H 面内键合引起的[21]。CFS/-20、CFS/-40、CFS/-60、CFS/-80 和 CFS/LN 的酰胺 A 带分别位于 3307 cm^{-1} 、 3311 cm^{-1} 、 3315 cm^{-1} 、 3317 cm^{-1} 和 3311 cm^{-1} , 表明 N-H 键参与氢键的形成。酰胺 III 带与胶原的三螺旋结构紧密相关, 当酰胺 III 带与 1454 cm^{-1} 的透射峰比值(IR)为 1.0 时, 表明胶原蛋白的三螺旋结构保存完整[22]。不同预冻温度下, 胶原纤维海绵的 IR 值均大于 1, 因此可以认为预冻温度不影响胶原蛋白三螺旋结构。

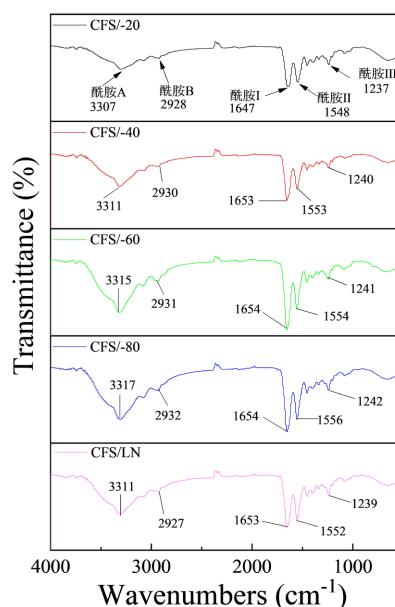


Figure 2. Effect of pre-freezing temperature on ATR-FTIR of collagen fibrillar sponge
图 2. 预冻温度对胶原纤维海绵 ATR-FTIR 的影响

3.3. 预冻温度对胶原纤维海绵 XRD 的影响

如图 3 所示, 经不同预冻温度处理后的胶原纤维海绵均出现两个峰。第一个峰为尖锐的衍射峰, 位于 $6^{\circ}\sim 8^{\circ}$ 附近, 是由纤维海绵的结晶区产生的[23]。第二个为宽且大的衍射峰位于 $20^{\circ}\sim 25^{\circ}$ 之间, 与海绵内无定形区域产生的漫散射有关。胶原分子一般自组装形成微纤丝, 然后通过分子间交联形成胶原纤维, 从而形成特有的分层交织结构[24]。从 CFS/-20 到 CFS/-80, 随预冻温度的降低, 第一个峰表现出更尖锐、强度更高的衍射峰。表明温度降低, 海绵的结晶区增大, 三螺旋含量增加[22]。原因可能是温度降低导致胶原纤维海绵氢键作用减弱。而 CFS/LN 出现较平坦的衍射峰, 强度降低, 可能是由于存在较强的氢键作用。这与 ATR-FTIR 的结果一致。根据布拉格方程, 从 CFS/-20 到 CFS/-80, 布拉格衍射角 θ 向右移动, 表明海绵的无定形区减少且更加有序[25]。

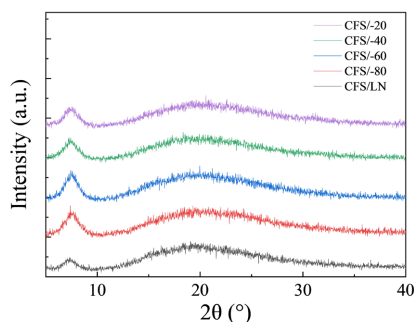


Figure 3. Effect of pre-freezing temperature on XRD of collagen fibrillar sponge
图 3. 预冻温度对胶原纤维海绵 XRD 的影响

3.4. 预冻温度对胶原纤维海绵孔隙率的影响

孔隙率是医用生物材料的重要参数, 是检测材料是否满足细胞生长要求的初步指标[26]。高孔隙率的结构能够促进细胞的附着和增殖, 在营养物质的运输和代谢物质的排出中起着重要作用, 然而高孔隙率往往对材料的机械性能表现负面影响[27]。如图 4 所示, CFS/-20 的孔隙率为 $83.07\% \pm 3.81\%$, 随着预冻温度的降低, 海绵的孔隙率逐渐增大, 可能与胶原纤维海绵的致密度减小有关。CFS/-60、CFS/-80 和 CFS/LN 的孔隙率无显著性差异, 分别为 $95.16\% \pm 2.55\%$ 、 $96.37\% \pm 2.67\%$ 、 $97.17\% \pm 1.93\%$, 与鲨鱼胶原支架的孔隙率相似[28]。用鱼鳞胶原蛋白制成的海绵具有 90% 以上的孔隙率, 可用于皮肤浅表伤口的止血治疗[29], 由此推测 -60°C 、 -80°C 和液氮预冻的海绵更有利于在止血材料领域的应用。

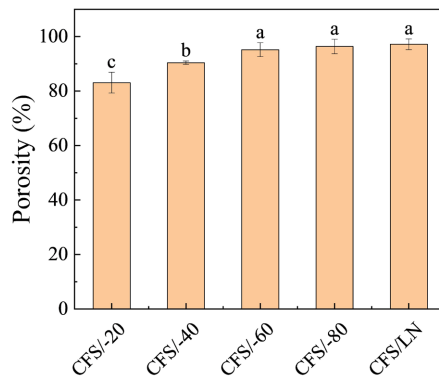


Figure 4. Effect of pre-freezing temperature on porosity of collagen fibrillar sponge
图 4. 预冻温度对胶原纤维海绵孔隙率的影响

3.5. 预冻温度对胶原纤维海绵吸水率和保水率的影响

吸水和保水性是生物材料的重要特征之一。高吸水性不仅有利于细胞的粘附和生长, 而且有利于营养物质在细胞间的运输和代谢产物的排出[30]。预冻温度对胶原纤维海绵吸水率和保水率的影响如图 5 所示。CFS/-20、CFS/-40、CFS/-60、CFS/-80 和 CFS/LN 的吸水率分别为 $1779.52\% \pm 107.29\%$ 、 $1867.74\% \pm 41.64\%$ 、 $1969.81\% \pm 80.63\%$ 、 $2003.73\% \pm 35.57\%$ 和 $2097.81\% \pm 171.51\%$, 可以看出随着预冻温度的降低, 海绵的吸水率呈现增长趋势, 原因主要是海绵的孔隙率逐渐增大。并且海绵的吸水率明显高于鲨鱼胶原/羟基磷灰石支架[28]、鲨鱼胶原/壳聚糖支架[28]、鱼胶原/海藻酸盐/壳寡糖复合海绵支架[31]。然而, 不同预冻温度下海绵的保水率没有显著差异, 主要与预冻未影响网络结构中亲水性基团密切相关[32]。

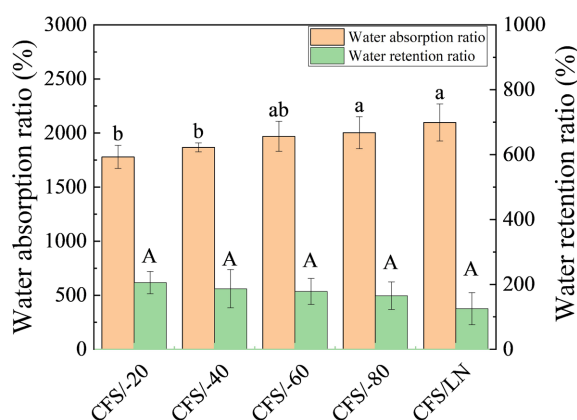


Figure 5. Effect of pre-freezing temperature on water absorption ratio and water retention ratio of collagen fibrillar sponge

图 5. 预冻温度对胶原纤维海绵吸水率和保水率的影响

3.6. 预冻温度对胶原纤维海绵机械性能的影响

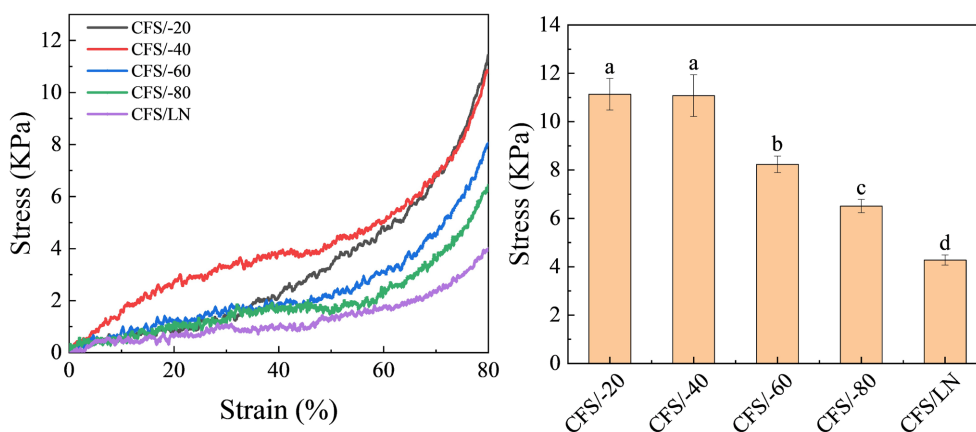


Figure 6. Typical compression stress-strain curves of collagen fibrillar sponge

图 6. 胶原纤维海绵的典型压缩应力-应变曲线

胶原基材料的机械性能对其在组织工程中的应用非常重要, 特别是在填充空间和保持形状方面[33]。为了进一步探究预冻温度对胶原纤维海绵的机械性能的影响, 本研究采用压缩试验进行表征, 所得应力-应变曲线如图 6 所示。可以看出随着预冻温度的降低, 海绵的最大压缩应力逐渐降低。CFS/-20 和 CFS/-40

的最大压缩应力相近, 分别为 11.13 ± 0.64 KPa 和 11.08 ± 0.86 KPa, 该结果与氧化硫酸软骨素/胶原纤维凝胶的压缩强度相似[33]。随着预冻温度的降低, 海绵的最大压缩应力逐渐降低。当用液氮预冻时, 海绵的最大压缩应力为 4.28 ± 0.21 KPa, 原因主要是液氮预冻较好的保持了纤维海绵的形状, 未出现体积收缩现象, 从而使得三维网络结构中纤维的致密度低于其他预冻温度。

3.7. 预冻温度对胶原纤维海绵抗酶解性能的影响

抗酶解性能对于生物材料的应用具有重要意义。如作为伤口敷料应用, 海绵的适度降解不仅有利于保持伤口的持续修复效果, 而且能够避免愈合过程中频繁换药造成的二次伤害[34]。此外, 生物材料的降解还与细胞分化密切相关。研究表明, 体外快速降解可以更有效地促进软骨分化, 而慢速降解在维持软骨表型和体内软骨基质保留方面更具优势[35]。胶原纤维结构稳定, 不易被中性蛋白酶、碱性蛋白酶等常见蛋白酶所降解, 然而胶原酶可通过切割三螺旋结构域中 775 和 776 氨基酸残基形成的肽键从而降解胶原蛋白[36]。因此, 本研究采用 I 型胶原酶对胶原纤维海绵的体外降解行为进行评价, 结果如图 7 所示。可以看出样品的降解率均随着时间的延长而增加。当降解时间达到 8 h 时, CFS/-20、CFS/-40、CFS/-60、CFS/-80 和 CFS/LN 的降解率分别达到 $89.81\% \pm 0.87\%$ 、 $90.89\% \pm 0.71\%$ 、 $93.99\% \pm 0.74\%$ 、 $94.66\% \pm 0.13\%$ 和 $95.06\% \pm 0.76\%$, 说明随着预冻温度的降低, 海绵的酶降解率逐渐增加。研究表明海绵的降解速率取决于凝胶的交联程度、孔隙率以及降解介质中酶的浓度[36]。本研究中, CFS/-20 表现出较好的抗酶解性能, 主要与纤维网络结构致密度较大有关, 这种空间位阻阻碍了胶原酶达到胶原纤维的酶切位点[30]。

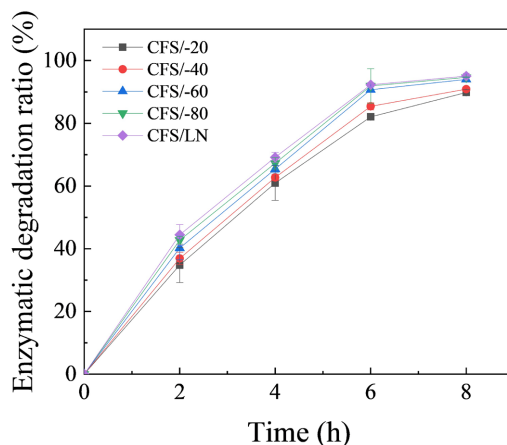


Figure 7. Effect of pre-freezing temperature on enzymatic degradation ratio of collagen fibrillar sponge

图 7. 预冻温度对胶原纤维海绵酶降解率的影响

4. 结论

预冻温度对罗非鱼皮胶原纤维海绵的结构和性能具有显著影响。在较高的预冻温度下, 胶原纤维海绵存在明显的体积缩小的现象, 从而导致纤维网络结构致密度的增大, 进而导致海绵性能的变化。 -20°C 和 -40°C 的预冻温度有利于纤维海绵机械性能和抗酶解性能的增强, 但是对孔隙率和吸水性表现负面影响。 -80°C 和液氮预冻处理使海绵的孔隙率和吸水性达到最大值, 但是却使机械性能和抗酶解性能低于其他条件。综合分析上述性能, 液氮预冻处理的海绵表面更加平整光滑, 形貌更加均匀, 且表现较高的孔隙率和吸水性, 更有利于细胞迁移和营养物质的扩散, 其较低的机械性能和抗酶解性能可通过交联等方法改进。该研究为胶原纤维海绵材料的开发和应用提供基础和参考。

基金项目

山东省自然科学基金面上项目: 绿原酸和原花青素交联罗非鱼皮胶原纤维水凝胶的构建及生物学性能, 项目编号: ZR2021MD050。

参考文献

- [1] 李家柔, 倪剑波, 何静怡, 等. 超声辅助酶法提取罗非鱼皮胶原蛋白及其溶解特性[J]. 渔业现代化, 2022, 49(6): 127-134.
- [2] 韩玮, 邢瀚文, 施文正, 等. 罗非鱼胶原蛋白4种制备方法比较研究[J]. 河南农业大学学报, 2020, 54(1): 102-108.
- [3] Rahman, M.A. (2019) Collagen of Extracellular Matrix from Marine Invertebrates and Its Medical Applications. *Marine Drugs*, **17**, Article 118. <https://doi.org/10.3390/md17020118>
- [4] 赵雲, 桂朗, 陈良标. 罗非鱼产业发展现状[J]. 中国水产, 2020(10): 46-48.
- [5] 《2019 中国渔业统计年鉴》[J]. 世界农业, 2020(3): 2.
- [6] 赵志霞, 吴燕燕, 李来好, 等. 我国罗非鱼加工研究现状[J]. 食品工业科技, 2017, 38(9): 363-367, 373.
- [7] Alves, A.P.N.N., Lima Júnior, E.M., Piccolo, N.S., de Miranda, M.J.B., Lima Verde, M.E.Q., Ferreira Júnior, A.E.C., et al. (2018) Study of Tensiometric Properties, Microbiological and Collagen Content in Nile Tilapia Skin Submitted to Different Sterilization Methods. *Cell and Tissue Banking*, **19**, 373-382. <https://doi.org/10.1007/s10561-017-9681-y>
- [8] Sun, X., Huang, X., Liao, X. and Shi, B. (2010) Adsorptive Recovery of UO_2^{2+} from Aqueous Solutions Using Collagen-Tannin Resin. *Journal of Hazardous Materials*, **179**, 295-302. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2010.03.002>
- [9] 王珠珠, 王利强. 胶原基海绵的研究进展[J]. 皮革与化工, 2018, 35(3): 21-26.
- [10] Yan, X., Chen, Y., Dan, W., Dan, N. and Li, Z. (2022) *Bletilla striata* Polysaccharide Modified Collagen Fiber Composite Sponge with Rapid Hemostasis Function. *Journal of Leather Science and Engineering*, **4**, Article No. 5. <https://doi.org/10.1186/s42825-022-00079-2>
- [11] Pawelec, K.M., Husmann, A., Best, S.M. and Cameron, R.E. (2014) Understanding Anisotropy and Architecture in Ice-Templated Biopolymer Scaffolds. *Materials Science and Engineering: C*, **37**, 141-147. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2014.01.009>
- [12] An, X., Duan, S., Jiang, Z., Chen, S., Sun, W., Liu, X., et al. (2022) Role of Chlorogenic Acid and Procyanidin in the Modification of Self-Assembled Fibrillar Gel Prepared from Tilapia Collagen. *Polymer Degradation and Stability*, **206**, Article 110177. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2022.110177>
- [13] Feng, X., Zhang, X., Li, S., Zheng, Y., Shi, X., Li, F., et al. (2020) Preparation of Aminated Fish Scale Collagen and Oxidized Sodium Alginate Hybrid Hydrogel for Enhanced Full-Thickness Wound Healing. *International Journal of Biological Macromolecules*, **164**, 626-637. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.07.058>
- [14] Yu, X., Li, J., Yang, M., Chen, C., Munir, S., You, J., et al. (2021) Role of Epigallocatechin Gallate in Collagen Hydrogels Modification Based on Physicochemical Characterization and Molecular Docking. *Food Chemistry*, **360**, Article 130068. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130068>
- [15] Fernandes-Cunha, G.M., Chen, K.M., Chen, F., Le, P., Han, J.H., Mahajan, L.A., et al. (2020) In Situ-Forming Collagen Hydrogel Crosslinked via Multi-Functional PEG as a Matrix Therapy for Corneal Defects. *Scientific Reports*, **10**, Article No. 16671. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-72978-5>
- [16] He, L., Lan, W., Wang, Y., Ahmed, S. and Liu, Y. (2019) Extraction and Characterization of Self-Assembled Collagen Isolated from Grass Carp and Crucian Carp. *Foods*, **8**, Article 396. <https://doi.org/10.3390/foods8090396>
- [17] 赵改名, 王壮壮, 祝超智, 等. 超声波辅助酶法提取牛皮胶原蛋白及其结构表征[J]. 食品工业科技, 2023, 44(9): 190-199.
- [18] Zhang, J., Wei, B., He, L., Xu, C., Xie, D., Paik, K., et al. (2017) Systematic Modulation of Gelation Dynamics of Snakehead (*Channa argus*) Skin Collagen by Environmental Parameters. *Macromolecular Research*, **25**, 1105-1114. <https://doi.org/10.1007/s13233-017-5149-y>
- [19] Oh, S., Nguyen, Q.D., Chung, K. and Lee, H. (2020) Bundling of Collagen Fibrils Using Sodium Sulfate for Biometric Cell Culturing. *ACS Omega*, **5**, 3444-3452. <https://doi.org/10.1021/acsomega.9b03704>
- [20] Li, H., Liu, B.L., Gao, L.Z. and Chen, H.L. (2004) Studies on Bullfrog Skin Collagen. *Food Chemistry*, **84**, 65-69. [https://doi.org/10.1016/s0308-8146\(3\)00167-5](https://doi.org/10.1016/s0308-8146(3)00167-5)
- [21] Muyonga, J.H., Cole, C.G.B. and Duodu, K.G. (2004) Characterisation of Acid Soluble Collagen from Skins of Young and Adult Nile Perch (*Lates niloticus*). *Food Chemistry*, **85**, 81-89. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2003.06.006>

- [22] Wang, J., Pei, X., Liu, H. and Zhou, D. (2018) Extraction and Characterization of Acid-Soluble and Pepsin-Soluble Collagen from Skin of Loach (*Misgurnus anguillicaudatus*). *International Journal of Biological Macromolecules*, **106**, 544-550. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.08.046>
- [23] Yan, M., An, X., Duan, S., Jiang, Z., Liu, X., Zhao, X., *et al.* (2022) A Comparative Study on Cross-Linking of Fibrillar Gel Prepared by Tilapia Collagen and Hyaluronic Acid with EDC/NHS and Genipin. *International Journal of Biological Macromolecules*, **213**, 639-650. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.06.006>
- [24] Andonegi, M., Heras, K.L., Santos-Vizcaíno, E., Igartua, M., Hernandez, R.M., de la Caba, K., *et al.* (2020) Structure-Properties Relationship of Chitosan/Collagen Films with Potential for Biomedical Applications. *Carbohydrate Polymers*, **237**, Article 116159. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116159>
- [25] Qu, W., Guo, T., Zhang, X., Jin, Y., Wang, B., Wahia, H., *et al.* (2022) Preparation of Tuna Skin Collagen-Chitosan Composite Film Improved by Sweep Frequency Pulsed Ultrasound Technology. *Ultrasonics Sonochemistry*, **82**, Article 105880. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2021.105880>
- [26] Valenzuela-Rojo, R.D., López-Cervantes, J., Sánchez-Machado, D.I., Escárcega-Galaz, A.A. and del Rosario Martínez-Macias, M. (2020) Antibacterial, Mechanical and Physical Properties of Collagen-Chitosan Sponges from Aquatic Source. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, **15**, Article 100218. <https://doi.org/10.1016/j.scp.2020.100218>
- [27] Ji, Q., Zhang, H., Zhang, X., Ma, Q., Teng, L. and Qiu, L. (2020) Hydrosoluble Collagen Based Biodegradable Hybrid Hydrogel for Biomedical Scaffold. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, **31**, 2199-2219. <https://doi.org/10.1080/09205063.2020.1796229>
- [28] Elango, J., Zhang, J., Bao, B., Palaniyandi, K., Wang, S., Wenhui, W., *et al.* (2016) Rheological, Biocompatibility and Osteogenesis Assessment of Fish Collagen Scaffold for Bone Tissue Engineering. *International Journal of Biological Macromolecules*, **91**, 51-59. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.05.067>
- [29] Muthukumar, T., Prabu, P., Ghosh, K. and Sastry, T.P. (2014) Fish Scale Collagen Sponge Incorporated with *Macrotyloma uniflorum* Plant Extract as a Possible Wound/Burn Dressing Material. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **113**, 207-212. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2013.09.019>
- [30] Jithendra, P., Rajam, A.M., Kalaivani, T., Mandal, A.B. and Rose, C. (2013) Preparation and Characterization of Aloe Vera Blended Collagen-Chitosan Composite Scaffold for Tissue Engineering Applications. *ACS Applied Materials & Interfaces*, **5**, 7291-7298. <https://doi.org/10.1021/am401637c>
- [31] Chandika, P., Ko, S., Oh, G., Heo, S., Nguyen, V., Jeon, Y., *et al.* (2015) Fish Collagen/Alginate/Chitoooligosaccharides Integrated Scaffold for Skin Tissue Regeneration Application. *International Journal of Biological Macromolecules*, **81**, 504-513. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.08.038>
- [32] 李永旭, 郭芳, 吴明丽, 等. 高吸水保水伤口敷料的研究进展[J]. 弹性体, 2022, 32(6): 72-79.
- [33] Zhang, Y., Shen, L., Cheng, Y. and Li, G. (2021) Stable and Biocompatible Fibrillar Hydrogels Based on the Self-Crosslinking between Collagen and Oxidized Chondroitin Sulfate. *Polymer Degradation and Stability*, **193**, Article 109742. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2021.109742>
- [34] Yang, C., Zhang, Y., Tang, P., Zheng, T., Zhang, X., Zhang, Y., *et al.* (2022) Collagen-Based Hydrogels Cross-Linked via Laccase-Mediated System Incorporated with Fe³⁺ for Wound Dressing. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **219**, 112825. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2022.112825>
- [35] Kong, W., Gao, Y., Liu, Q., Dong, L., Guo, L., Fan, H., *et al.* (2020) The Effects of Chemical Crosslinking Manners on the Physical Properties and Biocompatibility of Collagen Type I/Hyaluronic Acid Composite Hydrogels. *International Journal of Biological Macromolecules*, **160**, 1201-1211. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.05.208>
- [36] Selvakumar, G. and Lonchin, S. (2020) Fabrication and Characterization of Collagen-Oxidized Pullulan Scaffold for Biomedical Applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, **164**, 1592-1599. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.07.264>